

CAO99010-C3. MEJORA DE LA SANIDAD Y DE LA CALIDAD EN LA PROPAGACIÓN VIVERÍSTICA DEL OLIVO.

P. Castillo¹, C. del Río², C. Azcón-Aguilar³, E. Pérez Artés¹, J. Bejarano², J. M. Barea³, A. Gómez Barcina¹, R. Azcón³, J. M. Caballero Reig² y R. M. Jiménez Díaz¹.

¹ Instituto de Agricultura Sostenible, (CSIC), Avda Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080-Córdoba.

² Centro de Investigación y Formación Agraria “Alameda del Obispo”(IFAPA), Avda. Menéndez Pidal s/n, Apdo. 3092 14004-Córdoba.

³ Estación Experimental del Zaidín, (CSIC), c/ Profesor Albareda 1, 18008-Granada.

RESUMEN

El uso de suelo y material de plantación libres de patógenos durante la propagación del olivo son medidas de lucha clave para prevenir las enfermedades causadas por patógenos de suelo transmisibles en material infectado y prevenir la dispersión de dichos patógenos. Por tanto, en este proyecto se ha investigado la detección molecular *in planta* de los patotipos defoliante y no defoliante de *V. dahliae* y se han estudiado diversas estrategias de desinfestación de sustratos viverísticos de olivo incluyendo la solarización de pilas cónicas de sustrato, enmiendas del sustrato con compost o la biofumigación con paja de sorgo. Además, se ha evaluado la eficacia de la termoterapia de plantones de olivo para controlar infecciones por nematodos fitoparásitos en el sistema radical de los cvs. Arbequina y Picual. Finalmente, también fue evaluado el efecto protector de las micorrizas arbusculares (*Glomus intraradices*, *G. mossae*, *G. viscosum*) contra infecciones por *Meloidogyne* spp. en plantones de olivo cvs. Arbequina y Picual. Se ha desarrollado un procedimiento basado en la nested-PCR para la detección *in planta* de los patotipos defoliante y no-defoliante de *V. dahliae* en plantones de olivo. Mediante el uso combinado de los iniciadores específicos de cada patotipo y diferentes protocolos de nested-PCR utilizando como molde ADN genómico total extraído de plantones de olivo, ha sido posible la detección consistente de ambos patotipos, tanto en raíces como en tallo de plantones infectados. La solarización durante 3 semanas de sustrato viverístico apilado (con una altura máxima de 40 cm) en Andalucía es apropiada para optimizar la producción de plantones de olivo libres de nematodos fitoparásitos. La enmienda del sustrato viverístico con residuos agroindustriales (p. ej. compost de corcho en proporción al 50%) puede ser una estrategia viable para minimizar las infestaciones de *Meloidogyne* spp. La biofumigación de sustratos conteniendo paja de sorgo (2% y 4% p/p) determinó una reducción significativa de la viabilidad e infectividad del inóculo de *Meloidogyne incognita*, independientemente de la concentración de sorgo y la cubierta con plástico. Los tratamientos de termoterapia (35-55° C) redujeron significativamente el crecimiento de los plantones en los cvs. Arbequina y Picual, independientemente de la edad de la planta (6-8 o 16-18 meses), y por tanto no son aconsejables para controlar infecciones de raíz por nematodos lesionadores. La inoculación de plantones con micorrizas arbusculares protegió a los plantones de olivo cvs. Arbequina y Picual de la patogénesis causada por *Meloidogyne* spp. Este efecto de protección determinó un mayor crecimiento de las plantas micorrizadas e infectadas por el nematodo comparado con el de las plantas infectadas por el nematodo y no micorrizadas.

Palabras clave: biofumigación, control de patógenos, diagnóstico molecular *in planta*, *Meloidogyne* spp., micorrizas arbusculares, olivo, *Olea europaea*, *Pratylenchus* spp., solarización, termoterapia, *Verticillium dahliae*.

SUMMARY

The use of pathogen-free planting material and soil during olive plant propagation is essential for minimizing the effects of single or concomitant infections by soilborne pathogens during the early years of olive cultivation and for preventing pathogen spread. Consequently, in this project we have investigated the molecular *in planta* detection of defoliating and non-defoliating pathotypes of *V. dahliae*. Similarly, the potential of several soil disinfestation strategies as soil solarization of piled soil, amending of soil with compost or biofumigation with sorghum straw was studied. Similarly, the effectiveness of thermotherapy of olive planting stocks to control infections by plant-parasitic nematodes in root systems of cvs. Arbequina and Picual was also evaluated. Finally, the protective effect of arbuscular mycorrhizae (*Glomus intraradices*, *G. mossae*, *G. viscosum*) was also tested against infections of olive planting stocks by *Meloidogyne* spp. A PCR-based procedure has been developed for the early and consistent detection of defoliating and non-defoliating pathotypes of *V. dahliae* in infected olive planting stocks. By the combined use of specific external and internal primers and different nested-PCR protocols it was possible the detection of each of the two pathotypes of *V. dahliae* both in root and stem tissues of infected olive planting stocks. Solarization of piled soil (at a maximum depth of 40 cm) in nurseries in Andalucía is appropriate for optimizing production of plant-parasitic nematode-free olive plants. Amending olive soil nurseries with composted agro-industrial wastes (i.e. dry cork compost) may be a viable approach for minimizing soil infestations by *Meloidogyne* spp. Biofumigation of substrates used in nursery production by means of sorghum straw (2 % and 4 % w/w) as amendment determined a significant reduction of inoculum viability and infectivity of *Meloidogyne incognita*, and *V. dahliae* irrespective of straw concentration and plastic tarping. Hot-water treatments (35-55 °C) significantly reduced plant growth in both olive cultivars Arbequina and Picual, irrespective of plant age (6-8 or 16-18 months), and therefore are not suitable for the control of root infections of olive planting stocks by root-lesion or root-knot nematodes. Inoculation of olive planting stocks with arbuscular mycorrhizal fungi protects ‘Picual’ and ‘Arbequina’ olives from pathogenesis caused by *Meloidogyne* spp. This protection effect determined higher growth rates in infected mycorrhized, plants compared with non mycorrhized infected controls.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, biofumigation, control, in planta molecular detection, *Meloidogyne* spp., olive, *Olea europaea*, *Pratylenchus* spp., solarization, thermotherapy, *Verticillium dahliae*.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La sanidad de nuevas plantaciones de olivar requiere que para su establecimiento se utilice material vegetal de propagación y plantación libre de patógenos que se transmiten en material infectado. Por ello, es necesario poner en práctica acciones que aseguren que el material de plantación está libre de éstos patógenos, que conciernen en particular a la utilización de plantones y sustratos de crecimiento libres de *Verticillium dahliae* y nematodos fitoparásitos. Este trabajo se ha planteado con el objetivo general de desarrollar y aplicar innovaciones técnicas en el sector viverístico del olivo que permitan mejorar la calidad del material de plantación, certificar su estado sanitario respecto de hongos (*V. dahliae*) y nematodos (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.), y asegurar su protección frente a subsiguientes infecciones por inóculos existentes en suelos infestados mediante el establecimiento en su sistema radical de hongos micorrícicos y/o rizobacterias. Por ello, los objetivos concretos del presente Proyecto han sido:

1. Desarrollar técnicas de diagnóstico molecular no destructivas, basadas en la técnica de PCR-específica, que permitan la certificación de plantones de olivo libres de infección por los patotipos defoliante y no defoliante de *V. dahliae*.

2. Comprobar la eficacia de distintas técnicas y tratamientos que posibiliten el saneamiento en vivero de plantones de olivo infectados por *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *V. dahliae*.

- 2.1. Evaluar la eficiencia de métodos físicos (solarización) y biológicos (biofumigación) para la desinfestación de los sustratos de uso viverístico, y su posible efecto sobre el crecimiento de la planta.

- 2.2. Determinar la eficacia de tratamientos de termoterapia para la erradicación de *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *V. dahliae* del sistema radical de plantones de olivo (optimización del tiempo y temperatura de aplicación, influencia de la edad de la planta y de la naturaleza del cultivar).

3. Mejorar las técnicas de micorrización y bacterización de plantones de olivo, y determinar sus efectos sobre el vigor de la planta y la protección contra infecciones por *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *V. dahliae*.

- 3.1. Determinar la fase óptima durante el proceso de propagación para establecer la micorrización.

- 3.2. Determinar la influencia del tipo de sustrato (suelo artificial arena-limo, sustratos comerciales) en la respuesta de la planta.

- 3.3. Evaluar comparativamente la eficiencia de la micorrización y/o bacterización en diferentes genotipos de olivo.

- 3.4. Determinar el efecto protector de la micorrización y/o bacterización frente a infecciones por *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *V. dahliae*.

METODOLOGÍA

Los experimentos se han llevado a cabo utilizando material vegetal procedente de las variedades establecidas en el Banco Mundial de Germoplasma del CIFA “Alameda del Obispo” en Córdoba. Su multiplicación, realizada por estaquillado semileñoso bajo nebulización, así como la crianza de las plantas ha sido realizada según la metodología descrita por Caballero y del Río (2001). El trabajo se ha centrado en los cultivares “Arbequina” y “Picual” que son los de mayor relevancia en la producción de aceite de oliva en España.

Para el diagnóstico molecular de *V. dahliae* en planta se ha desarrollado un procedimiento basado en la “nested-PCR”, para demostrar la presencia de ADN de *V. dahliae* en extractos de ADN genómico total obtenido de raíces y tallos de plantones de olivo del cv. Picual. Dicho desarrollo ha incluido: a) la puesta a punto de un método de extracción de ADN de tejidos leñosos infectados, de calidad PCR; b) el diseño de pares de iniciadores específicos de los patotipos defoliante (D) [D1/D2] y no-defoliante (ND) [NDf/NDr] de *V. dahliae*; así como de otros internos en las secuencias que amplifican (INTD2f/INTD2r; INTNDf/INTNDr); y c) la puesta a punto de un protocolo de “nested”-PCR específica para cada patotipo. La validez del procedimiento diagnóstico desarrollado se ha contrastado utilizando diversos cultivares de olivo (Arbequina, Hendeño, Oblongo, Picual) infectados de forma artificial o natural y de edad comprendida entre 4-14 meses o varios años.

Se han realizado experimentos de solarización para evaluar la eficiencia con que puede ser desinfectado un suelo viverístico artificialmente infestado con el nematodo nodulador *Meloidogyne incognita* y con *V. dahliae*. Para ello se han utilizado pilas de sustrato viverístico de 1 m de diámetro y 60-70 cm de altura, en las que se han introducido a 20 y 40 cm de profundidad bolsitas de nylon de 5 µm de malla con inóculo de ambos patógenos. Se ha utilizado el patotipo defoliante de *V. dahliae* y una población de *M. incognita* aislada de viveros de olivo, y como sustratos arena-limosa y arena-limosa + turba.

También se han desarrollado investigaciones para determinar el uso potencial de enmiendas orgánicas compostadas de restos de corcho para el control de *M. incognita* en plántones de olivo. Para ello, el sustrato viverístico utilizado en la fase de crianza de los plántones se mezcló con compost de corcho en proporciones de 0, 25, 50, 75 y 100%, v/v y dicha mezcla se infestó artificialmente con 10.000 huevos y juveniles de segunda edad de *M. incognita*. Similarmente, el efecto de la biofumigación de sustrato viverístico (consistente en la utilización de productos de la descomposición de las enmiendas orgánicas y los residuos agrarios como fumigantes) se estudió mediante la adición al mismo de paja de sorgo triturada (2 %, 4 %, p/p) a los mismos. Para ello, los sustratos viverísticos se dispusieron en bandejas de plástico, se infestaron artificialmente con *M. incognita*, y la viabilidad del inóculo se evaluó mediante un bioensayo de infección en plantas de tomate cv. Roma susceptibles a dicho nematodo, 2 meses después del trasplante. Para el control de *V. dahliae* la biofumigación consistió en incorporar al suelo, previamente infestado, dos dosis de restos de sorgo o colza, combinada o no con recubrimiento plástico. Para determinar la posible fitotoxicidad de los sustratos tratados se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de crianza en vivero.

Asimismo, se ha evaluado el efecto de la termoterapia para erradicar infecciones de nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) y noduladores (*Meloidogyne* spp.). Para ello, se han realizado experimentos para determinar el porcentaje de mortalidad de diferentes estados migratorios del nematodo (*Pratylenchus vulnus*), utilizando tratamientos térmicos *in vitro* con temperaturas entre 35 y 55° C durante periodos de tiempo comprendidos entre 2 y 16 minutos. Y se ha evaluado el efecto de la aplicación de estos tratamientos de termoterapia sobre el crecimiento de plántones de olivo "Picual" y "Arbequina" de 8-12 meses de edad.

Se ha estudiado la efectividad de la micorrización en la fase de endurecimiento de las estaquillas enraizadas utilizando como sustratos arena-limosa, arena-limosa + turba + vermiculita y turba + vermiculita. Además, se ha evaluado el efecto protector de la micorrización frente a la infección por *V. dahliae* y *Meloidogyne* spp. en plántones de olivo 'Arbequina' y 'Picual' co-inoculados simultáneamente por los hongos endomicorrícicos *Glomus intraradices* (BEG 123), *G. mossae* (BEG 119) y *G. viscosum* (BEG 126) y ambos patógenos, en experimentos en condiciones artificiales óptimas para el desarrollo de la infección por éstos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los plántones de vivero empleados en las nuevas plantaciones de olivar contienen tanto el sistema radical de la planta como el sustrato de crianza, los cuales pueden ser vehículos de formas infectivas de diversos patógenos de suelo, incluyendo *V. dahliae* y especies de nematodos fitoparásitos. De hecho, este proyecto ha constatado que dichos sustratos pueden estar infestados por varias especies de nematodos fitoparásitos (Nico *et al.*, 2002). Además, nuestros resultados y los de otros investigadores indican que la infección de los plántones de olivo por los nematodos noduladores *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, y los nematodos lesionadores de raíz *P. penetrans* y *P. vulnus*, reduce significativamente el crecimiento de los plántones (Nico *et al.*, 2003a; Sasanelli *et al.*, 2002). Por tanto, para el establecimiento de nuevas plantaciones de olivar es necesario poner en práctica acciones que aseguren que el material de plantación está libre de éstos patógenos.

En este proyecto se han desarrollado varios procedimientos para mejorar la sanidad y la calidad del sistema de propagación de plántones de olivo que pueden ser objeto de transferencia al sector viverístico del olivo para su aplicación inmediata. Los avances desarrollados y su aplicabilidad pueden concretarse en los siguientes aspectos:

- 1) Se ha desarrollado un procedimiento de análisis molecular basado en la 'nested' PCR, para la detección temprana y consistente de los patotipos defoliantes y no defoliantes de *V. dahliae* en plántones de olivo producidos en vivero, sintomáticos o no, utilizando muestras no destructivas de raíces o tallo de los plántones que puede ser completado en 72 h. Además, se ha demostrado que el procedimiento desarrollado es capaz de detectar la presencia del patógeno en plantas asintomáticas desde momentos muy tempranos tras la infección y bastante antes de que se desarrollen los primeros síntomas visibles de la enfermedad, así como en plantas que se habían recuperado de la enfermedad causada por el patotipo no defoliante. El procedimiento desarrollado tiene un gran potencial como herramienta molecular para análisis diagnóstico para plántones de olivo libres de *V. dahliae*. Además del indudable valor práctico como herramienta diagnóstica, la metodología desarrollada en este proyecto ofrece un valor potencial para estudios epidemiológicos y del desarrollo de la infección y enfermedad en la verticilosis del olivo (Mercado Blanco *et al.*, 2001; 2002).
- 2) Se ha desarrollado un método para la desinfestación de sustratos de uso viverístico en olivo infestados por nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) o *V. dahliae*. Dicha metodología ha demostrado que las pilas de sustrato viverístico infestadas de 40 cm de altura pueden ser desinfestadas mediante un proceso hidrotérmico

generado por el calor solar retenido bajo una película de plástico transparente (solarización), que redujo la capacidad infectiva de *M. incognita* (Nico *et al.*, 2003b) y de *V. dahliae* por encima del 95% respecto de la del inóculo contenido en los sustratos no solarizados. Asimismo, se ha comprobado que la solarización de los sustratos no afecta el crecimiento de las plantas producidas en vivero (del Río *et al.*, 2002)

- 3) Se ha demostrado que la utilización de ciertas enmiendas orgánicas (p. ej. compost de corcho,) en diversas proporciones reduce significativamente la población viable e infectiva de *M. incognita* y constituye una estrategia de control complementaria con la anterior. En este caso, la reducción de la población del nematodo se ajustó a un modelo exponencial, y fue superior al 95% en sustratos enmendados en una proporción igual o mayor al 75% de compost de corcho (Nico *et al.*, 2004). La adición de residuos de sorgo con recubrimiento plástico redujo en un 30-60% la densidad inicial de inóculo de *V. dahliae*. Dicha enmienda, al menos en las dosis utilizadas (2.5 y 5 % sobre peso seco de suelo) tampoco afectó la pauta de crecimiento de 'Picual' durante su crianza en vivero (del Río *et al.*, 2002)
- 4) Los resultados de los bioensayos de biofumigación con paja de sorgo indicaron una reducción significativa de la viabilidad de huevos y juveniles de *M. incognita* respecto de los controles sin biofumigar, independientemente del porcentaje de sorgo empleado y de la utilización de cobertura plástica del suelo tratado. Sin embargo, la máxima reducción de viabilidad del inóculo alcanzada fue del 60%, cuando el tiempo de exposición a la enmienda de sorgo fue de 60 días después de la infestación (Nico *et al.*, 2003c). La biofumigación mediante la utilización de sorgo también redujo la población de *M. incognita*, aunque la máxima reducción alcanzada fue insuficiente, y en todo caso, fue menos eficiente que los tratamientos anteriores.
- 5) Se ha demostrado que la micorrización de plantones de olivo de los cvs. Arbequina y Picual con los hongos endomicorrícicos *Glomus intraradices*, *G. mossae*, *G. viscosum* protege a dichas plantas de la patogénesis causada por los nematodos noduladores *M. incognita* y *M. javanica*. Este efecto de protección determinó un crecimiento de las plantas infectadas por el nematodo y micorrizadas significativamente mayor comparado con el de las plantas infectadas por el nematodo y no micorrizadas.

En resumen, el nivel de eficiencia alcanzado mediante la aplicación individualizada de cada una de las estrategias de control señaladas anteriormente, sugieren la conveniencia de combinar (integrar) estas prácticas de desinfestación de sustratos viverísticos y la inoculación con microorganismos protectores con objeto de incrementar sus posibilidades de aplicación y aumentar su eficacia. Además, dichas prácticas admiten ser integradas de forma simultánea o secuencial, y son totalmente compatibles.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria que financió a través del proyecto CAO99-010-C3 el trabajo presentado.

BIBLIOGRAFÍA

- Caballero, J. y del Río, C. 2001. Métodos de Multiplicación, 90-117. En: el cultivo del olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Junta de Andalucía, Mundi-Prensa. 724 pp.
- Del Río, C., J.M. Caballero, M^a J de la Torre y J. Bejarano. 2002. Mejora de la calidad y de la sanidad en la propagación viverística del olivo, 145-148. En Jornadas de investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola, Córdoba 20-21 de noviembre de 2002. Editado por D.G.I.E.A. (Junta de Andalucía) y D.A.P., 415 pp.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E. & Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant Pathology* 50: 609-619.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E. & Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 1-13.
- Mercado Blanco, J., Rodríguez Jurado, D., Parrilla Araujo, S., Pérez Artés, E., y Jiménez Díaz, R. M. 2002. Diagnóstico molecular de los patotipos defoliante y no defoliante de *Verticillium dahliae* en plantas de olivo infectadas. Jornadas de Investigación y Transferencia de Tecnología al sector oleícola. Córdoba, Noviembre 2002, pp. 165-169.
- Nico, A. I. 2002. Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía, y estrategias para su control. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 291 pp.
- Nico, A. I., Rapoport, H. F., Jiménez-Díaz, R. M. & Castillo, P. 2002. Incidence and population density of plant-parasitic nematodes associated with olive planting stocks at nurseries in southern Spain. *Plant Disease* 86: 1075-1079.

- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M., & Castillo, P. 2003a. Host suitability of the olive cultivars Arbequina and Picual for plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 35: 29-34.
- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M. & Castillo, P. 2003b. Solarization of soil in piles for the control of *Meloidogyne incognita* in olive nurseries in southern Spain. *Plant Pathology* 52: 770-778.
- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M., & Castillo, P. 2003c. Plant-parasitic nematodes in olive nurseries in Andalusia. *Olivae* 96: 25-32.
- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M. & Castillo, P. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection* 24: in press.
- Sasanelli, N., D'Addabbo, T., & Moura Lemos, R. 2002. Influence of *Meloidogyne javanica* on growth of olive cuttings in pots. *Nematropica* 32 : 59-63.
- Teva Fernández, M. 2001. Control de *Pratylenchus vulnus*, el nematodo lesionado de raíz, mediante tratamientos de termoterapia. Proyecto Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba, 129 pp.